

文章编号: 1001-1498(2006)04-0446-06

# 新疆杨胰蛋白酶抑制剂基因的克隆与表达<sup>\*</sup>

梁文星<sup>1</sup>, 范在丰<sup>1</sup>, 李永<sup>2</sup>, 宋丽敏<sup>1</sup>, 李怀方<sup>1</sup>, 田国忠<sup>2\*\*</sup>

(1. 中国农业大学植物病理系, 北京 100094;

2. 中国林业科学研究院森林生态环境和保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

**摘要:**杨树受损伤后能诱导一些基因的表达, 其编码的蛋白质可能在杨树的防卫反应中起一定作用。用 PCR 方法从新疆杨叶片中克隆出一个损伤诱导型 Kunitz 胰蛋白酶抑制剂基因 *PaTI*。序列分析表明: 此基因不含内含子, 其翻译起点上游具有 'TATA' 和 'CCAAT' 等转录控制元件, 包含的阅读框架能编码一个长为 213 个氨基酸的多肽。此多肽与克隆自美洲山杨的 PtTI 和 PtTII 氨基酸序列同源性最高, 分别为 95% 和 80%, 其 N 端存在一长度为 27 个氨基酸的信号肽。将此基因以融合蛋白的形式在大肠杆菌中进行表达, 纯化后的融合蛋白对胰蛋白酶的活性有抑制作用, 每 8.5 μg 融合蛋白可完全抑制 1 μg 牛胰蛋白酶的活性。Western blot 分析表明融合蛋白与 PtTI 特异的抗体之间有明显的血清学反应。

**关键词:**蛋白酶抑制剂基因; 新疆杨; 损伤诱导

中图分类号: S792.11 文献标识码: A

## The Cloning and Functional Expression of a Kunitz Trypsin Inhibitor Gene from *Populus alba* var. *pyramidalis*

LIANG Wen-xing<sup>1</sup>, FAN Zai-feng<sup>1</sup>, LI Yong, SONG Li-min, LI Huai-fang<sup>1</sup>, TIAN Guo-zhong<sup>2</sup>

(1. Plant Pathology Department, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forestry Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Wounding of poplar trees leads to the accumulation of several mRNA species that encode proteins with putative defensive function. A Kunitz trypsin inhibitor gene was isolated from *Populus alba* var. *pyramidalis* by RT-PCR. The gene was expressed in *E. coli* as recombinant protein and its product was shown to have inhibitor activity to trypsin *in vitro*. No evident affinity was found between the recombinant protein and bovine trypsin. Western blotting analysis showed that the recombinant protein could strongly recognize the antibody specifically for PtTI from trembling aspen.

**Key words:** trypsin inhibitor (TI) gene; *Populus alba* var. *pyramidalis*; wound inducement

为了抵抗病原物的侵染及食草动物的危害, 植物在生长发育过程中产生大量的蛋白水解酶类如几丁质酶、-1, 3 葡聚糖酶以及蛋白酶抑制剂 (Proteinase Inhibitor, PI) 等<sup>[1]</sup>。PI 是一类能够抑制蛋白酶活性的小分子蛋白或多肽, 存在于所有的生物体内, 是自

然界数量最多的一类蛋白质<sup>[2]</sup>。昆虫危害或病原物侵染能诱导植物的防卫反应, 而 PI 则是众多防卫反应化学物质中的一类<sup>[3]</sup>。在自然界中 PI 的作用主要有: (1) 防止细胞、组织及器官中蛋白质的过度水解, 因为蛋白质的过度水解对于其生化及生理过程

收稿日期: 2005-06-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目“树木育种的分子基础研究”(973 项目)(G1999016003)

作者简介: 梁文星 (1979—), 男, 山东泰安人, 在读博士研究生, 研究方向为植物病毒分子生物学。

\* 致谢: 感谢宁夏回族自治区固原市林业局提供新疆杨树苗; 感谢加拿大 Peter Constabel 教授惠赠 PtTI 抗血清。

\*\* 通讯作者: 田国忠 (1963—), 男, 研究员, 主要从事森林病理学和分子生物学研究。

非常不利; (2) 保护细胞、组织及器官中的蛋白质免遭外源蛋白水解酶的水解<sup>[2]</sup>。早在 1954 年, Lipke 等就发现含有大豆胰蛋白酶抑制剂的大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.) 浸提物可抑制拟谷盗 (*Tribolium confusum* Jac. du Val) 的生长<sup>[4]</sup>。1976 年, Peng 和 Black 发现, 受到致病疫霉 (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) 侵染的番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 叶片表现出胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶抑制剂活性的增强<sup>[5]</sup>, 此后对侵染烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 和西瓜 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) 等植物的病原真菌、细菌和病毒的研究中也观察到类似的现象<sup>[6-8]</sup>。1987, Hilder 等将豇豆 (*Vigna unguiculata* (Linn.) Walp.) 胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea Trypsin Inhibitor, CpTI) 基因转化烟草并表达成功, 首次获得了蛋白酶抑制剂抗虫性的直接证据<sup>[9]</sup>。根据所抑制的蛋白水解酶的种类, 可将 PI 分为丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serine Proteinase Inhibitor)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cysteine Proteinase Inhibitor)、天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (Aspartic Proteinase Inhibitor) 及金属蛋白酶抑制剂 (Metallo-Proteinase Inhibitor) 等<sup>[3]</sup>。其中丝氨酸蛋白酶抑制剂引起了人们更多的关注<sup>[2]</sup>。到目前为止, 至少已经从杨树 (*Populus* spp.) 中分离了 15 个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因<sup>[10-14]</sup>。

据报道, 新疆杨 (*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.) 等白杨派 (Sect. *Leuce* Duby) 杨树对杨树溃疡病 (*Dothiorella gregaria* Sacc.) 和天牛 (*Anoplophora glabripennis* (Motsh.)) 的抗性比小叶杨 (*P. simonii* Carr.) 和大关杨 (*P. × dakuanensis* Hsu) 要高得多<sup>[15]</sup>。为了更好地了解新疆杨对昆虫、病原物及损伤的防卫反应机制, 作者从新疆杨中克隆了一个胰蛋白酶抑制剂基因 PaTI 1, 并将该基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chermers) 中进行了表达, 从而为将其进一步应用于抗虫和抗病的杨树转基因育种创造了条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及损伤处理

新疆杨幼苗采自宁夏回族自治区固原市, 栽植在北京中国林科院。当杨树约 50 cm 高 (具有约 25 片叶子) 时用钳子对下部 10 片叶子进行损伤处理<sup>[16]</sup>, 48 h 后, 采集上部 4 片叶子提取总 RNA。

### 1.2 总 RNA 的提取

使用 TRIZOL 试剂 (Invitrogen) 提取叶片总

RNA。取 50 ~ 100 mg 叶片放在研钵中, 液氮速冻后立即研磨成粉末, 加入 1 mL TRIZOL 试剂, 并进行氯仿抽提, 异丙醇沉淀后溶于 DEPC 处理的水。

### 1.3 PaTI 1 基因 cDNA 部分片段的序列测定

根据克隆自香脂杨 × 美洲黑杨 (*P. balsamifera* DuRoi × *P. deltoides* Bartr.) 的蛋白酶抑制剂基因 PSCH D, PSCH IF, PSCH IH (GenBank 登录号分别为 M25339, M25341 和 M25343) 设计引物扩增新疆杨胰蛋白酶抑制剂基因的部分片段。反转录使用的引物为 PBR (5'-TTATTGTCCTCAACTCCGAACC-3'), 反应条件为 42 °C, 1 h。PCR 使用引物 PBF (5'-GATA-ATA GGCAA TCGACTTCC-3') 和 PBR, 反应条件为: 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 60 s, 35 个循环。用博大泰克 DNA 凝胶回收试剂盒将 PCR 产物回收后连接到 pMD18-T (Takara) 载体上。转化、筛选后由申友公司对重组克隆测序, 并对所测序列进行 BLAST 分析。

### 1.4 PaTI 1 基因编码区序列的测定

参照 Murray 和 Thompson<sup>[17]</sup> 的方法提取植物总 DNA。根据克隆自毛果杨 × 美洲黑杨 (*P. trichocarpa* Torr et Gray × *P. deltoides* Bartr.) 的 *Gwin 3* 基因 (GenBank 登录号 X15516) 和克隆自美洲山杨 (*P. tremuloides* Michx.) 的 *PtTI 2* 基因 (GenBank 登录号 AF349442) 的序列设计引物, 用以扩增 PaTI 1 基因。PCR 反应引物为 PIFL5F / PIFL3R: 5'-AACCTATATGACAACCTCGTCG-3' / 5'-CCTCAA TCA TICTGACACC-3', 反应条件为 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 35 个循环。克隆和测序方法同前。

### 1.5 序列比较

用 DNAMAN 软件 (Lynnon Biosoft, 版本 4.0) 将 DNA 序列翻译为氨基酸序列, 并且将其与 GenBank 中的序列进行 BLAST 分析。多重比对使用 DNAMAN 软件。

### 1.6 原核表达

以提取的杨树总 DNA 为模板扩增 PaTI 1 基因的编码区 (不包括信号肽序列), 正向引物为 PIF5F (5'-GCCAAGCTTGAA GA TCCTGCA GCA GTG-3'), 反向引物为 PIF3R (5'-CGTCTCGAGCTCAA TCA TCTGACACC-3')。PCR 产物纯化后用 *Hind* 和 *Xho* 酶切, 质粒 pET-22b (+) (Novagen) 同样用 *Hind* 和 *Xho* 双酶切。将经酶切处理的 PCR 产物及载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5。对重组质粒进行测序以验证读码框的正确性。将读框正确

的重组子及 pET-22b (+) 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落于 3 mL 含 Amp 60 μg · mL<sup>-1</sup> 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜后, 按 1:100 稀释到新鲜的含 Amp 60 μg · mL<sup>-1</sup> 的 LB 液体培养基中, 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4 ~ 1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol · L<sup>-1</sup>, 继续于 37 °C 培养 3 ~ 4 h, 离心收集菌体, SDS-PAGE<sup>[18]</sup> 检测蛋白表达情况。电泳完毕后, 电转移法转膜, 丽春红 S 染色检测转移效率。转移后的硝酸纤维素膜先以 5% 的脱脂奶粉封闭, 然后分别以 PtTI2 抗体、碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白 (Sigma) 温育, 最后用 NBT/BCIP 显色对表达产物进行 Western blot 分析<sup>[19]</sup>。

### 1.7 融合蛋白的纯化与活性测定

收集的菌体用抽提缓冲液重悬, 反复冻融 3 次后, 12 000 g 离心 15 min 收集包含体<sup>[20]</sup>, 溶解后, 使用脲浓度逐渐降低的溶解缓冲液对融合蛋白进行透析, 使之复性。当脲的浓度达到 1 mol · L<sup>-1</sup> 时, 加入 3 mmol · L<sup>-1</sup> 还原型谷胱苷肽和 1 mmol · L<sup>-1</sup> 氧化型谷胱苷肽, 然后于 4 °C 透析过夜。根据 Bradford 的方法<sup>[21]</sup> 测定融合蛋白的浓度。根据 Kim 等的方法<sup>[22]</sup> 测定融合蛋白的活性。首先将 0.1 mL 融合蛋白与 0.1 mL 胰蛋白酶 (10 μg) 混合, 30 °C 温育 10 min, 然后加入浓度为 1 mmol · L<sup>-1</sup> 的 BAEE (Sigma)

2.8 mL, 以不含融合蛋白的上述溶液为对照测定 253 nm 处的吸光值变化, 每分钟读数 1 次, 反应持续 9 min。

## 2 结果

### 2.1 PaTI 1 基因 cDNA 部分片段的序列测定

分别从损伤处理后和损伤处理前的杨树叶片中提取总 RNA, RT-PCR 后, 电泳检测, 发现从前者中扩增出了一 180 bp 的 cDNA 片段, 但后者没有, 序列分析显示 PCR 产物编码胰蛋白酶抑制剂, 说明此基因是损伤诱导表达型基因。BLAST 分析证明此 cDNA 与克隆自 *P. tremuloides* 的 *PtTI2* 基因和克隆自 *P. trichocarpa* × *P. deltoides* 的 *Gwin3* 基因同源性最高。

### 2.2 PaTI 1 基因编码区序列的测定

为从新疆杨基因组 DNA 中分离出胰蛋白酶抑制剂基因, 根据 *PtTI2* 基因和 *Gwin3* 基因序列设计引物, 以新疆杨基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。电泳检测, 扩增出一 846 bp 片段。此片段中最大的开放阅读框架能编码 213 个氨基酸 (GenBank 登录号 AY671800), 且不含内含子, 在翻译起始位点上游合理位置处有转录控制元件 “TATA 框” 和 “CCAAT” 框 (图 1)。

```

1 AACCTA TA TGACAA CTCTGTCGCCCTA GGACTA TAA TTTTTA GTTTTGTCGGAAA TCA GCA
61 CGAGTAAAA CACT CCAAT TTA TA TTCCAAA TAA TCCTAAA TGCTTGCTCCA TATAAA A TA
121 CGCTCTCCA TGCGTTGTTTCAACACAA GA TCAACAA GACACAA TA TTGA GA TAACTAA T
181 CTCA TA TCAACAAA TA TGAA GA TCAC TAAA TTICTA GGGCTCTCTTCTCTCTCTTTC
1 M K I T K F L G L S F L L F A
241 CTTCGCA GCAACTTTA TTTCTTGA GGGCGTTCA TGCCGAA GA TCCTGCA GCA GTGCTCGA
16 F A A T L F P E G V H A E D P A A V L D
301 TTCTACGGTCGTGA GGTGCAA GCTGGTACTCCCTA TT TAA TCCTAA GA TCCTCTTACGA
36 F Y G R E V Q A G T P Y L I Q D L S Y E
361 ACCGGGTAA TACA TCAAA TTTTGTGGTGGTGC GACTA TCAACCCCA TA TGCAA TTCA GA
56 P G N T S N F V V G A T I N P I C N S D
421 TGTTGTA CTTTCTACGA GAACGACGGCTCCCA GTAACA TTTTACCA GTTACAGAA TC
76 V V L S Y E N D G L P V T F S P V T E S
481 CACCGA TGGTGTA TCCGCGAA GGAAC TCTTIR TAACTGTGA GCTTTGA TGCA GACACA TG
96 T D G V I R E G T L X T V S F D A D T C
541 TAA TA TGACA GGCGTGACACCCA TGTGGAA GA TTGGA TTCAA TTCAAAA GGA GA GGA TA
116 N M T G V T P M W K I G F N S K R R G Y
601 CA TTGTGACCA CA GGA GGTGTGTA TCAA TTGAA TCA GTTGA TGA TCACCAAGGA TAAAA
136 I V T T G G V D Q L N Q F M I T K D K N
661 TGAGA GTA TTTT TTA TCA GCTTCTTIA TTGTCCAAA GTCCGA TCCCTTTTGTGAA TGCTC
156 E S S F Y Q L S Y C P K S D P F C E C S
721 ATGCGTCCCA GTTGGCGCCACCAA TGACAA GTACTTGGCTCCCAAA GCCGCCGTGTGCTGT
176 C V P V G A T N D K Y L A P K A A V V V
781 TGA TGTTA GGT T TAAACCGGAA T TAAA TATTTA TGGTGA TAAAA TGGTGTCA GAA TGA TA
196 D V R F K P E L N I Y G D K M V S E *
841 TTGAGG

```

图 1 PaTI1 基因核苷酸及其推测的氨基酸序列 (下划线部分表示信号肽, “TATA 框” 和 “CCAAT 框” 用方框标出)

序列分析显示所克隆的 *PaTI 1* 在核苷酸水平上与 *PtTI 2*、*PtTI 1* 和 *Gwin 3* 的同源性分别为 98%、90% 和 85%。将此基因的核苷酸序列翻译成氨基酸序列后发现其氨基端可能存在一长度为 27 个氨基酸的信号肽,切割后会产生一分子量为 20.3 kD 的多肽。将此氨基酸序列进行 BLAST 分析,发现其与 *PtTI 2*、*PtTI 1* (*P. tremuloides*)、*PnTIH 1.1* (*P. nigra* L.), *Gwin 3*、*PnTIH 1.2* (*P. nigra*) 和 *Win 3.12* (*P. trichocarpa* × *P. deltoides*) 的同源性最高,分别为 95%、80%、74%、73%、73% 和 72%,但其中只有 *PtTI 2* 的胰蛋白酶抑制剂活性已被证明。比对分析发现,此 7 个多肽氨基酸序列的信号肽部分比其编码区更为保守,因此,这 7 个多肽可能在细胞内相同的位置起作用。根据构建的进化树可以看出,*PaTI 1* 与 *PtTI 2* 和 *PtTI 1* 具有较近的亲缘关系(图 2)。

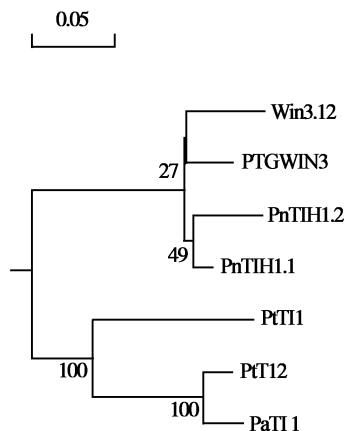


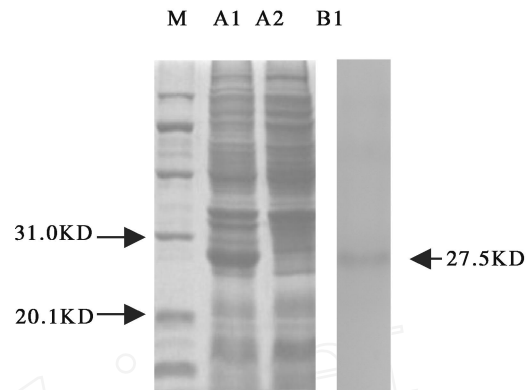
图 2 *PaTI 1* 与其它杨树中 6 种蛋白酶抑制剂的系统进化树分析。  
由 DNAMAN 软件构建

### 2.3 *PaTI 1* 基因的原核表达

将重组子 pET-*PaTI 1* 进行 PCR 和酶切验证后,转化大肠杆菌 BL21,并进行 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 后,考马斯亮蓝染色结果表明:含 pET-*PaTI 1* 的菌株特异地产生了一分子量为 27.5 kD 的条带。由于 *PtTI 2* 与 *PaTI 1* 氨基酸序列的同源性为 95%,因此以 *PtTI 2* 抗血清对融合蛋白进行免疫检测。Western blot 显示,*PtTI 2* 抗血清仅与此 27.5 kD 的诱导表达产物反应,而与其它条带之间均无反应,证明此条带即为所需要的产物(图 3)。

### 2.4 融合蛋白的纯化与活性测定

融合蛋白用前面所述的方法进行纯化及复性后,Bradford 法测定其浓度为  $245 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用  $24.5 \mu\text{g}$  的融合蛋白与  $10 \mu\text{g}$  的牛胰蛋白酶温育后,



M, 蛋白分子量标准; A1, 带有 pET-*PaTI 1* 的 BL21; A2 带有 pET-22b(+) 的 BL; B1, 融合蛋白的 Western blot 分析

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

胰蛋白酶的活性低于对照。根据活性测定曲线可知,每  $8.5 \mu\text{g}$  融合蛋白可完全抑制  $1 \mu\text{g}$  胰蛋白酶的活性(图 4)。

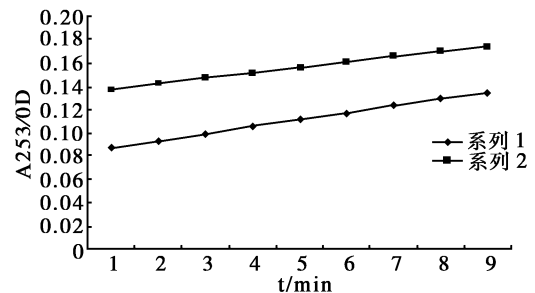


图 4 融合蛋白的体外活性测定。系列 1 为融合蛋白的活性测定曲线;系列 2 为对照

## 3 讨论

新疆杨在中国西北地区广泛种植,包括甘肃、陕西、青海以及宁夏等。虽然新疆杨对害虫和病原表现出较高抗性,但人们对与抗性相关的蛋白质及其相应基因却了解很少。对损伤的系统反应是蛋白酶抑制剂基因的一个典型特征。通过 PCR 从新疆杨未受损伤的上部叶片(对其下部叶片进行损伤处理)中分离了一个胰蛋白酶抑制剂基因,“TATA 框”和“CCAAT 框”位于翻译起始位点上游合理位置处,而且基因内部没有内含子。此蛋白酶抑制剂与一功能已知的、损伤诱导型的胰蛋白酶抑制剂 *PtTI 2* 有较高的同源性。由于 *PaTI 1* 与其它已分离的胰蛋白酶抑制剂在信号肽部分有较高的同源性,因此推测这些蛋白酶抑制剂定位于细胞内相同位置。推测 *PaTI 1* 基因为多基因家族的一员,理由为:(1)从杨

树中分离的其它胰蛋白酶抑制剂基因都属于多基因家族；(2)新疆杨对许多害虫有较高的抗性，一种蛋白酶抑制剂对一些害虫中的蛋白酶有效，但对另一些害虫中的蛋白酶则无效<sup>[23]</sup>。为抵御含有不同活性蛋白酶的害虫的侵害，新疆杨应含有多种具不同特异性的蛋白酶抑制剂；(3)已发现一些害虫中的胰蛋白酶对一些胰蛋白酶抑制剂具有抗性，新疆杨含有多种具不同活性的胰蛋白酶抑制剂应该是对此现象的一种适应<sup>[13]</sup>。

损伤导致 *PaTI 1* 基因的过量表达，而 *PqsaT I* 蛋白的过量产生可能有助于杨树抵抗病虫害为害。调查表明，白杨派包括新疆杨、毛白杨 (*P. tomentosa* Carr) 比青杨派 (*Sect. laciniata* Spach) 的大关杨、小叶杨对天牛和溃疡病有相对较高的抗性<sup>[24]</sup>。尽管以前曾经对此做过不少研究，但是到目前为止其抗性机制仍然不甚清楚。在本项实验的基础上，可以合成 DNA 或 RNA 的探针用以检测具有不同抗性特征的不同杨树品种中 *PaTI 1* 基因的表达情况。据估计，*PaTI 1* 基因的反应时间、特异性、活性及 *PaTI 1* 蛋白的量都可能与抗性机制相关。由昆虫取食或病原侵染诱导而产生的损伤信号可能最先引起杨树的一系列特异的及非特异的损伤诱导的防卫反应，包括蛋白酶抑制剂、几丁质酶， $\alpha$ -1, 3 葡聚糖酶和过氧化物酶的产生，而这些酶的产生都与各种逆境有或多或少的关系<sup>[11]</sup>。

本研究中所表达的融合蛋白的活性远远低于 *PtTI 2* ( $0.75 \mu\text{g PtTI 2}$  能完全抑制  $1 \mu\text{g}$  牛胰蛋白酶的活性)，可能是因为：(1)纯化后的融合蛋白复性不完全；(2)以融合蛋白形式存在，折叠时遮盖了其活性位点；(3)在大肠杆菌中表达的蛋白其翻译后的修饰不同于真核生物，虽然曾有报道翻译后的修饰对胰蛋白酶抑制剂的活性影响很小<sup>[25]</sup>；(4)两种抑制剂的氨基酸序列差异。

虽然有些蛋白酶抑制剂在体外具有抑制蛋白酶的活性，但在转基因植物中其抗虫活性并不明显<sup>[26]</sup>。将此基因导入杨树、果树和作物，并测定转基因植物的抗虫活性，尤其是对编码丝氨酸蛋白酶的病毒的抗性作用值得进一步研究。

#### 参考文献：

[1] Ryan C A. Systemic response to wounding[A]. In: Denno R, McClure M. Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems[M]. Academic Press, New York, 1983: 43 ~ 60  
[2] Ryan C A. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for trans-

formation to improve plant defenses against herbivores [J]. BioEssays, 1989, 10: 20 ~ 24  
[3] Ryan C A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens [J]. Annu Rev Phytopathol, 1990, 28: 425 ~ 449  
[4] Lipke H, Fraenkel G S, Liener I. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum* [J]. Agric Food Chem, 1954, 2: 410 ~ 414  
[5] Peng L H, Black L L. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans* [J]. Phytopathol, 1976, 66: 958 ~ 963  
[6] Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1990, 3: 327 ~ 333  
[7] Pautot V, Holzer F M, Walling L L. Differential expression of tomato proteinase inhibitor and genes during bacterial pathogen invasion and wounding [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1991, 4: 284 ~ 292  
[8] Roby D, Toppan A, Esquerre-Tugaye M T. Cell surface in plant microorganism interactions. Increased proteinase inhibitor activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction from this fungus [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1987, 30: 453 ~ 460  
[9] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheeman S E, et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco [J]. Nature, 1987, 330: 160 ~ 163  
[10] Bradshaw H D Jr, Hollick J B, Parsons T J, et al. Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato sporamins and legume Kunitz trypsin inhibitors [J]. Plant Mol Biol, 1989, 14: 51 ~ 59  
[11] Parsons T J, Bradshaw H D Jr, Gordon M P. Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86: 7895 ~ 7899  
[12] Hollick J B, Gordon M P. A poplar tree proteinase inhibitor-like gene promoter is responsive to wounding in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 561 ~ 572  
[13] Haruta M, Major I T, Christopher M E, et al. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory [J]. Plant Mol Biol, 2001, 46: 347 ~ 359  
[14] Nishiguchi M. A genomic DNA clone encoding trypsin inhibitor homolog [D].  
[15] 秦锡祥, 高瑞桐, 曹桂洪, 等. 抗光肩天牛杨树品种的筛选研究 [J]. 林业科学研究, 1993, 6(专刊): 42 ~ 45  
[16] Larson P R, Isebrands J G. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood [J]. Can J Forest Res, 1971, 1: 1 ~ 11  
[17] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucl Acids Res, 1980, 8: 4321 ~ 4325  
[18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Press, 1989

- [19] Towbin H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1979, 76: 4350 ~ 4354
- [20] 方敏, 黄华樑. 包涵体蛋白质体外复性的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2001, 17: 608 ~ 612
- [21] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 71: 248 ~ 254
- [22] Kim S H, Hara S, Hase S, *et al* Comparative study on amino acid sequences of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Tia, Tib, and Tic1 [J]. J Biochem, 1985, 98: 435 ~ 448
- [23] Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors [J]. Meth Plant Biochem, 1991, 5: 259 ~ 305
- [24] 赵天锡, 陈章水. 中国杨树集约栽培 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 269 ~ 307
- [25] Yeh K W, Chen J C, Lin M I, *et al* Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitor activity [J]. Plant Mol Biol, 1997, 33: 565 ~ 570
- [26] Confabonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, *et al* Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expression a Kunitz proteinase inhibitor (KTi3) gene [J]. Mol Breed, 1998, 4: 137 ~ 145

www.cnki.net